

Proliferación de *Trypanosoma cruzi* en la membrana peritoneal y líquido ascítico de ratones con infección aguda

Proliferation of Trypanosoma cruzi in the peritoneal membrane and ascitic liquid of mice with acute infection

Ana Lugo de Yarbuh¹, Karina Cáceres¹, Deisy Sulbarán¹, Sonia Araujo¹, Elio Moreno¹, Hernán José Carrasco², Cesare Colasante³, Nora Mogollón¹ & Maritza Alarcón*¹

RESUMEN

En este estudio fue analizada la parasitemia y el parasitismo en el líquido ascítico (LA), membrana peritoneal (MP) y en otros tejidos de 40 ratones machos NMRI durante la infección aguda. Los ratones (20 ratones por grupo) fueron inoculados por vía intradérmica con tripomastigotos metacíclicos linaje *T.cr I* de las cepas P6 y P11 obtenidos de *Rhodnius prolixus*. Formas delgadas y gruesas de tripomastigotos fueron encontradas en la sangre de todos los ratones. En los ratones infectados con la cepa P6 los tripomastigotos aparecieron primero en el LA a los 13 días pi y en la sangre a los 18 días pi, en los ratones infectados con la cepa P11 los parásitos se observaron primero en la sangre a los 15 días pi y en el LA a los 22 días pi. Los ratones desarrollaron emaciación, disnea, hirsutismo, pérdida de la actividad motora de las patas posteriores y hepatoesplenomegalia. Los ratones fueron sacrificados a los 39 días pi. El estudio histológico mostró que *T. cruzi* prolifera formando nidos de amastigotos y tripomastigotos en la MP. Los parásitos también fueron encontrados en el músculo esquelético y en el corazón de los ratones infectados con la cepa P6. La inmunotinción con PAP reveló antígeno de *T. cruzi* en las secciones de esófago, estómago, intestino delgado y grueso, bazo, riñón, hígado, próstata y pene de los ratones. Estos resultados confirmaron que las cepas P6 y P11 desarrollaron anomalías histopatológicas en el tracto gastrointestinal, renal y órgano reproductivo. La localización intra-peritoneal de los parásitos y la acumulación de fluido peritoneal, reveló ascitis y peritonitis causada por el incremento de líquido en la cavidad peritoneal y destrucción del tejido peritoneal de los ratones. El presente estudio reporta por primera vez la proliferación de tripomastigotos en la cavidad peritoneal cinco días antes de encontrarse en la sangre periférica para la cepa P6 causando daño intra-peritoneal y muerte del modelo murino utilizado.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, ratones, membrana peritoneal, ascitis, peritonitis

SUMMARY

In this study we analyzed the parasitemia and parasitism in the ascitic fluid (AF), peritoneal membrane (PM) and in other tissues of 40 NMRI male mice during acute infection. Mice (20 mice per group) were inoculated by intradermal route with metacyclic trypomastigotes T.cr I lineage of P6 or P11 strains obtained from Rhodnius prolixus. Slender and stout forms were observed in the blood of all mice. In infected mice with P6 strain the trypomastigotes were observed first in the AF at day 13 pi and in blood at day 18 pi. Meanwhile in infected mice with P11 strain trypomastigotes were observed first in the blood at day 15 pi and in the AF at day 22 pi. Infected mice showed emaciation, dyspnea, bristled hair, loss of motor activities in the rear limbs and hepatosplenomegaly. Mice were sacrificed at day 39 pi. Histological finding indicated that T. cruzi proliferates forming amastigotes and trypomastigotes nests in the PM. Parasites were also observed in skeletal muscle of the mice and in the heart of infected mice with P6 strain. Immunostaining with PAP revealed T. cruzi antigen in esophagus, stomach, thin and thick intestine, spleen, and kidney, liver, prostate and penis. The results show that P6 and P11 colonized and produced abnormalities in the gastrointestinal tract, renal and reproductive organs. Intra-peritoneal localization of parasites and accumulation of peritoneal fluid, revealed ascites and peritonitis caused by increase of fluid in the peritoneal cavity and destruction of the membrane peritoneal of the mice. This study reports for the first time the proliferation of trypomastigotes in the peritoneal cavity five days earlier than in peripheral blood for the P6 strain causing intra-peritoneal damage and death in the murine model used.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, mice, peritoneal membrane, ascites, peritonitis

¹Laboratorio de Parasitología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

²Laboratorio de Biología Molecular de Protozoarios, Instituto de Medicina Tropical, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

³Laboratorio de Fisiología de la Conducta, Facultad de Medicina, Mérida, Venezuela.

*Autor de correspondencia: amaritza@ula.ve

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), a través de la contaminación con excretas infectadas de insectos triatomíneos hematófagos, infectando a mamíferos entre los cuales se incluyen al humano y a otros animales silvestres y domésticos. Se le considera una de las parasitosis tropicales de mayor importancia en América Latina y se estima que cerca de 20 millones de personas se encuentran infectadas y de 2 a 3 millones son chagásicos crónicos (OPS, 2010).

Esta forma de transmisión vectorial en áreas rurales se alterna con otras formas de transmisión favorecida por las migraciones internas de la población hacia áreas urbanas, donde el contagio por *T. cruzi* puede ocurrir también a través de transfusiones sanguíneas, transplacentaria y con menor frecuencia por ingestión de alimentos contaminados (Dao, 1949; Díaz Bello *et al.*, 2008; Alarcón de Noya *et al.*, 2010).

En Venezuela la enfermedad de Chagas prevalece en aproximadamente 7 millones de personas que viven en sectores rurales montañosos de la región centro occidental así como, en las regiones oriental y central del país donde la población está en estrecho contacto con *Rhodnius prolixus* principal vector intradomiciliario y ocasionalmente con *Panstrongylus geniculatus* y *Triatoma maculata* (Feliciangeli *et al.*, 2004; Serrano *et al.*, 2008; Morocoima *et al.*, 2008; Bonfante-Cabarcas *et al.*, 2011).

Es importante señalar que la migración humana desde la región de los Llanos y Andina del país con alta prevalencia para la enfermedad de Chagas hacia sectores urbanos, ha favorecido la diseminación de *T. cruzi* hacia las zonas urbanas (Rodríguez-Bonfante *et al.*, 2007; Alarcón de Noya *et al.*, 2010; Carrasco *et al.*, 2012).

Los estudios sobre el comportamiento de *T. cruzi* en humanos y otros mamíferos han mostrado, variadas manifestaciones clínicas asociadas al potencial patógeno y al tropismo diferencial de los diversos genotipos del parásito que estén circulando (Brenière *et al.*, 2012).

La patogenidad de *T. cruzi* también se encuentra asociada a sus numerosas características

metabólicas diferenciales y a la estructura antigénica que puede expresar frente a hospedadores con condiciones genéticas propias y un sistema inmunológico establecido (Pedreira de Castro & Brener, 1985).

Las cepas de *T. cruzi* poseen potencial de invadir y lesionar los tejidos con diferente intensidad causando variada reacción inflamatoria. En este sentido, los estudios sobre el tropismo y grado de patogenidad de cepas de *T. cruzi* en modelos experimentales, han revelado que algunas cepas tienden a diseminarse en casi todos los tejidos (Galaviz *et al.*, 1992; Paredes *et al.*, 2009). La marcada heterogeneidad de algunas cepas de *T. cruzi* explicarían el fenómeno de paninfectividad (Lenzi *et al.*, 1996; Andrade, 2000).

En los modelos de laboratorio se ha observado que cuando ocurre la deposición de las heces contentivas de las formas infectantes o tripomastigotos metacíclicos sobre sus hospedadores mamíferos, los parásitos se diseminan hacia tejidos tales como el miocardio, esófago, colon, hueso y cartilago y dependiendo del caso, puede invadir la placenta, los fetos y plasma seminal de ratones con infección aguda (Moreno *et al.*, 2003; Morocoima *et al.*, 2006; Lugo de Yarbuh *et al.*, 2010; Sulbarán, 2011; Alarcón *et al.*, 2011; Cáceres, 2011). Debido a la diversidad de poblaciones naturales del parásito que se encuentran circulando, es necesario profundizar en estudios que vinculen el comportamiento biológico de las cepas de *T. cruzi*, con las manifestaciones clínicas, evolución de la parasitemia y tropismo tisular.

En el presente estudio evaluamos la infección aguda en ratones mediante el curso de la parasitemia patente, parasitismo en los tejidos y la patología chagásica causada por dos cepas de *T. cruzi*, aisladas del foco epidemiológico surgido en Chichiriviche, Estado Vargas, usando como fuente de infección tripomastigotos metacíclicos obtenidos de aislados mantenidos en vectores experimentales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Parásitos

Se utilizaron dos cepas de *T. cruzi*, M/HOM/VE/2009/P6 y M/HOM/VE/2009/P11 aisladas de dos casos agudos humanos procedentes de Chichiriviche

de la Costa en el Estado Vargas, Venezuela y mantenidas en *R. prolixus* en el laboratorio LAPEX de la Universidad de Los Andes.

Caracterización fenotípica de los aislados P6 y P11 (RAPD)

Se realizó la extracción de ADN de *T. cruzi* de las cepas P6 y P11 mantenidas en el medio NNN con el Kit Nucleón BACC2 (Amersham-Pharmacia) y luego fue seguida la cuantificación de ADN a longitudes de onda de 260-280λ. La ampliación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD) se realizó usando el primer A2 y la comparación de ADN con bandas características de la cepa de referencia internacional WA250 c110B representativa del genotipo TcI. El patrón de las bandas del ADN de *T. cruzi* de los aislados P6 y P11 fueron comparadas con las cepas de referencia para TcI y TcIII (Carrasco *et al.*, 1996).

Obtención de tripomastigotos metacíclicos de Rhodnius prolixus

Se utilizaron dos grupos de 20 ninfas de *R. prolixus* de IV estadio obtenidas del Insectario de cría "Dr. Herman Lent" del Departamento de Biología, Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes. Los triatomíneos fueron alimentados hasta la repleción sobre dos grupos de ratones machos NMRI infectados con las cepas P6 y P11 de *T. cruzi* respectivamente. A los 30 días de la ingesta sanguínea las ninfas infectadas fueron nuevamente alimentadas sobre ratones sanos y una vez ingurgitadas el contenido intestinal de cada ninfa fue recolectado, mezclado y homogenizado con solución fisiológica. Las muestras de heces fueron examinadas al microscopio con aumento de 400X a fin de obtener un inóculo de 2×10^4 tripomastigotos en 0,1 mL de suspensión (Brener, 1962).

Infección experimental de los ratones

Se utilizaron 40 ratones machos NMRI de 20 gr de peso y dos meses de nacidos separados en dos grupos de 20 ratones cada uno. Los animales fueron ligeramente anestesiados e inyectados por vía intradérmica (id) en la cara interna de la pata posterior derecha con un inóculo de 2×10^4 tripomastigotos metacíclicos de *T. cruzi* obtenidos de heces de ninfas de *R. prolixus* infectadas con las cepas P6 y P11 respectivamente. Diez (10) ratones sanos controles fueron inyectados por la vía id con 0,1 mL de solución salina. Los animales fueron mantenidos

en el Bioterio bajo condiciones controladas de temperatura ($22 \pm 20^\circ\text{C}$), humedad relativa ($54\% \pm 5\%$) y alimentadas con Ratarina(R) y agua *ad libitum*.

Determinación de la parasitemia

El curso de la infección fue seguido interdiariamente entre 4 y 36 días post-inoculación (pi), mediante el examen directo de muestras de sangre periférica extraídas de la porción distal de la cola de cada ratón, colocada en láminas portaobjeto y cubierta con cubreobjetos. El recuento de tripomastigotos se realizó en 100 campos microscópicos a 400X (Leica DM 500) (Brener, 1962).

Identificación de parásitos en el líquido ascítico (LA) y células inflamatorias

Para la detección de formas flageladas de *T. cruzi* en la cavidad peritoneal, las muestras de LA fueron obtenidas interdiariamente a partir del día 4 pi. Para tal fin los ratones fueron inyectados en la cavidad peritoneal con 300 μL de solución fisiológica estéril y cinco minutos después de la inyección se extrajeron muestras de 50 μL de LA de cada ratón infectado con las cepas P6 y P11 respectivamente. El número de tripomastigotos fue estimado en muestras de 5 μL de LA coloreadas con Giemsa al 20 % en un aumento de 40X, las células inflamatorias también fueron identificadas en las muestras de LA coloreadas con Giemsa al 20% (Araujo *et al.*, 2011).

Parasitismo tisular en los ratones infectados

A los ratones que sobrevivieron hasta los 39 días pi previa anestesia con cloroformo se les extrajeron los órganos. Las muestras de membrana peritoneal, músculo esquelético, corazón, pulmón, esófago, estómago, intestino delgado y grueso, riñón, hígado, bazo, ganglio poplíteo, vejiga, testículo y pene fueron fijadas con formalina neutra a los 10%, deshidratadas e incluidas en Paraplast (Monoject Scientific, St. Louis MO, USA). Los cortes de 7μm de espesor se colorearon con Hematoxilina y Eosina.

Análisis inmunohistoquímico para la detección de anticuerpos anti-T. cruzi en muestras de tejidos de ratones infectados

A 4 conejos machos de 2 Kg de peso se les inyectó por vía id una mezcla de 0,5 mL de suspensión

de antígeno de *T. cruzi* de las cepas P6 y P11 (1.500 µg de proteínas/mL) y 0,5 mL de adyuvante incompleto de Freund's (2 conejos por cada cepa). Posterior a la inoculación con 4 dosis del antígeno, se determinó el título de anticuerpos (Ac) mediante inmunofluorescencia indirecta (Camargo, 1966). El suero de conejo anti-*T. cruzi* con nivel de Ac superior a 1:2048 fue utilizado.

Para el análisis inmunohistoquímico con Peroxidasa-antiperoxidasa las secciones de tejidos de 7 mm de espesor fueron desparafinadas, hidratadas, tratadas con H₂O₂ al 3% en metanol, lavadas con PBS a pH 7,2, incubadas con suero normal de carnero diluido 1:32 con PBS, suero de conejo anti-*T. cruzi* diluido 1:100 en PBS y con suero anti-conejo-IgG-Peroxidasa (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) diluido 1:200 con PBS. Las muestras se revelaron con 3,3-Tetrahidrocloruro de Diaminobencidina (DAB), se lavaron con PBS, se contra colorearon con Hematoxilina de Mayer y se cubrieron con Mar-tex y cubreobjetos. La intensidad del parasitismo tisular fue revelada mediante la identificación de antígeno de *T. cruzi* de color marrón en los tejidos afectados (Sell & Burton, 1981).

Análisis estadístico

Se utilizó el test de Wilcoxon en el análisis estadístico no paramétrico para comparar los valores promedios de parasitemia patente entre las muestras de sangre y entre el número promedio de tripomastigotos en el LA de los ratones infectados con las cepas P6 y P11 respectivamente. Se consideró un nivel de significancia del 95% (Martín & del Castillo, 2004).

Consideraciones éticas

Los animales experimentales fueron tratados según las normas establecidas por el Comité de Bioética del Fondo Nacional de Ciencias y Tecnología en su capítulo 2 y Bioética animal en Venezuela (De Jesús, 2002).

RESULTADOS

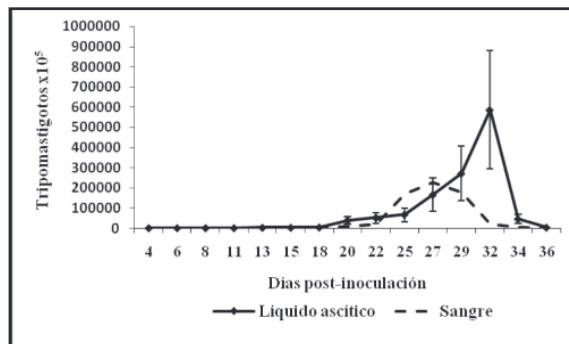
Durante el curso de la infección aguda se observó parasitemia patente y tripomastigotos en el LA de los ratones. El 80% (16/20) y el 76% (15,2/20) de los ratones infectados con las cepas p6 y P11 respectivamente sobrevivieron hasta los 39 días pi.

En los ratones infectados con la cepa P6, los tripomastigotos aparecieron primero en el LA a los 13 días pi con promedio inicial de parasitemia de $2,7 \times 10^3 \pm 1,8 \times 10^3$ tripomastigotos alcanzando nivel máximo de $5,9 \times 10^5 \pm 4,1 \times 10^5$ tripomastigotos a los 32 días pi. En la sangre periférica los tripomastigotos delgados y gruesos fueron detectados a los 18 días pi con promedio inicial de parasitemia de $3,4 \times 10^3 \pm 2,7 \times 10^3$ tripomastigotos y nivel máximo de $2,3 \times 10^5 \pm 1,9 \times 10^5$ tripomastigotos a los 27 días pi. Las muestras de sangre y de LA fueron negativas a los 39 días pi (Fig. 1). La mortalidad registrada de los ratones infectados con la cepa P6 fue del 20% (4/20).

En los ratones infectados con la cepa P11 los tripomastigotos se observaron primero en la sangre a los 15 días pi con un nivel inicial de $6,8 \times 10^2 \pm 6,1 \times 10^2$ tripomastigotos y un pico de parasitemia de $5,6 \times 10^4 \pm 1,5 \times 10^3$ tripomastigotos a los 32 días pi. En el LA los tripomastigotos se observaron a partir de día 22 pi, con valores promedios de $1,8 \times 10^4 \pm 9,1 \times 10^3$ tripomastigotos y un valor máximo de $5,0 \times 10^5 \pm 3,4 \times 10^4$ tripomastigotos a los 29 días pi (Fig. 2). Las muestras de sangre y de LA fueron negativas a los 39 días pi. La mortalidad registrada de los ratones infectados con la cepa P11 fue del 21% (5/20).

Las formas delgadas y gruesas de tripomastigotos en la sangre y las formas gruesas de tripomastigotos en el líquido ascítico de los ratones infectados con las cepas P6 y P11 respectivamente se observan en las Figs. 3 y 4.

Fig. 1. Curvas que representan los niveles de parasitemia patente \pm DE a partir del día 18 post-infección (pi) y el nivel más alto a los 27 días pi y número de tripomastigotos \pm DE en el líquido ascítico a partir del día 13 pi y nivel más alto a los 32 días pi en los ratones infectados con la cepa P6 de *T. cruzi*.



Las comparaciones (Test de Wilcoxon) de los valores promedios de tripomastigotos en la sangre de los ratones infectados con las cepas P6 y P11 mostraron diferencias significativas ($P=0,0426$), la comparación entre los valores de tripomastigotos en el LA de los ratones resultó no significativa ($P=0,769$).

Histopatología

En las secciones de MP de los ratones infectados con la cepa P6 de *T. cruzi*, se observaron nidos de amastigotos y de tripomastigotos, pérdida

Fig. 2. Curvas que representan los niveles de parasitemia patente \pm DE a partir del día 15 post-infección (pi) con nivel más alto a los 32 días pi y número de tripomastigotos \pm DE en el líquido ascítico a partir del día 22 pi y nivel más alto a los 27 días pi en los ratones infectados con la cepa P11 de *T. cruzi*.

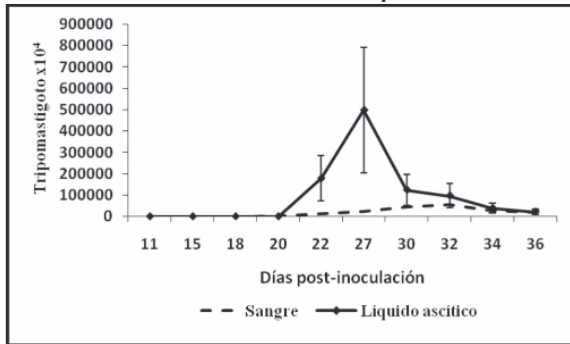
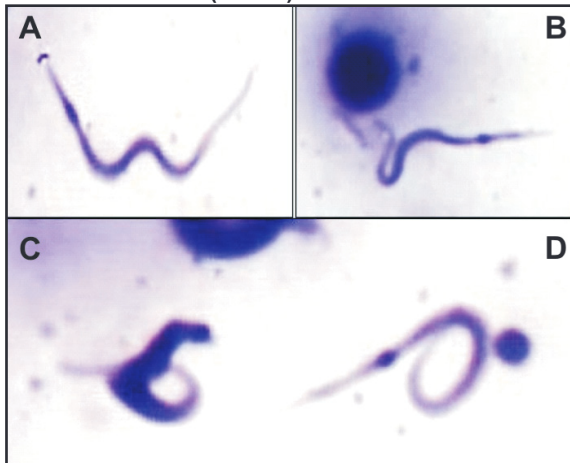


Fig. 3. Frotis de sangre periférica de ratones infectados con tripomastigotos metacíclicos de la cepa P6 que muestran: A) forma delgada del parásito, B) tripomastigotos delgados en contacto con linfocitos activados. C y D) formas gruesa y delgada del parásito junto a linfocito activado. Giemsa (1000X).



en la continuidad del tejido peritoneal y presencia de infiltrado inflamatorio celular mononuclear y polimorfonuclear (Figs. 5A y 5B).

En la MP de los ratones infectados con la cepa P11 se observaron nidos de amastigotos,

Fig. 4. Tripomastigotos, linfocitos y macrófagos activados en muestras del líquido ascítico obtenido de la cavidad peritoneal de ratones infectados con la cepa P11 de *T. cruzi*. Giemsa (250X).

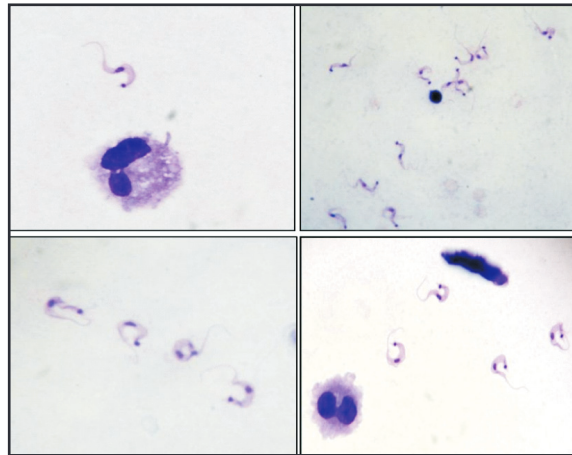
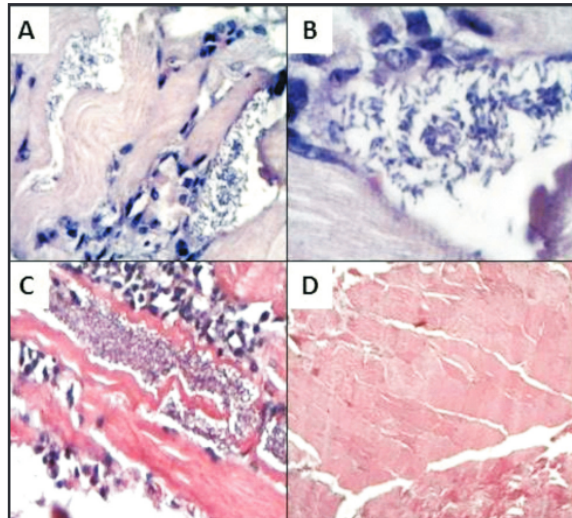


Fig. 5. A y B) Secciones de membrana peritoneal (MP) de ratones infectados con la cepa P6 de *T. cruzi* que muestran nidos de amastigotos y tripomastigotos y pérdida en la continuidad del tejido peritoneal e infiltrado celular (HE. 1000X). C) Sección de MP de ratón infectado con la cepa P11 de *T. cruzi* con nidos de amastigotos, infiltrado celular y destrucción del tejido peritoneal y D) MP de ratón sano. H-E (250X).



destrucción del tejido peritoneal e intenso infiltrado celular inflamatorio (Fig.5C).

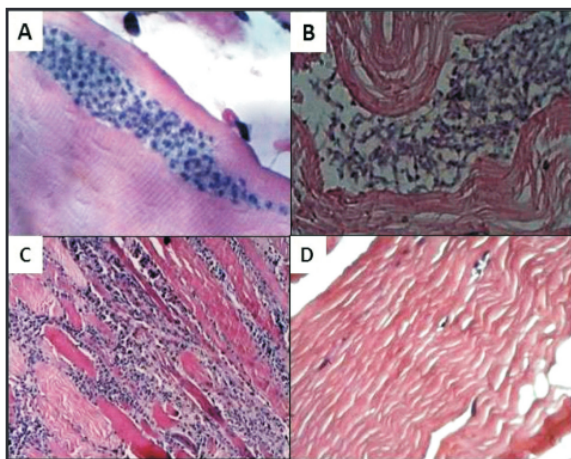
La infección con *T. cruzi* en ambos grupos de ratones también afectó el tejido muscular esquelético encontrándose nidos de amastigotos en el músculo de los ratones infectados con la cepa P6 y nidos de tripomastigotos en la fibra muscular esquelética de los ratones infectados con la cepa P11 (Fig. 6). Los nidos de amastigotos en el tejido cardíaco solo se observaron en los ratones infectados con la cepa P6. La intensidad del parasitismo y de infiltración tisular producida en los ratones infectados con las dos cepas de *T. cruzi* se muestran en la Tabla I.

El análisis inmunohistoquímico de los tejidos en ambos grupos de ratones infectados reveló la presencia de antígeno de *T. cruzi* en las secciones de bazo, riñón, hígado, estómago, intestino delgado y grueso, pulmón, vejiga, testículo y pene (Tabla I).

DISCUSIÓN

El análisis del comportamiento biológico de las cepas de *T. cruzi* estudiadas mostró que las cepas P6 y P11 resultaron ser altamente virulentas, generando elevada parasitemia y desarrollo de

Fig. 6. A) Sección de tejido muscular esquelético de ratón infectado con la cepa P6 de *T. cruzi* que muestra nido de amastigotos y fibra muscular cardíaca conservada, B) nido de tripomastigotos asociado a pérdida de continuidad de la fibra muscular esquelética de ratón infectado con la cepa P11 y C) intenso infiltrado de células mononucleares y polimorfonucleares en las fibras musculares. H-E (250 X). D) músculo esquelético de ratón sano. H-E (1000X).



parasitismo en la cavidad intra-peritoneal del modelo murino utilizado.

Las cepas desarrollaron elevada parasitemia patente y un dimorfismo con presencia de formas delgadas y gruesas en la sangre periférica de los ratones similar a otras cepas de *T. cruzi* de Venezuela y de otros países (Herrera *et al.*, 2003; Suárez, 2009; Berrizbeitia *et al.*, 2010).

Algunos autores han señalado que las cepas pleomórficas con predominio de formas delgadas, causan elevadas parasitemias y tropismo diferencial del parásito por células de defensa mononucleadas, parasitando más frecuentemente los macrófagos del bazo y del hígado y con mayor capacidad de invasión tisular y susceptibilidad a los anticuerpos. En este sentido la diferencia en cuanto a la severidad de la enfermedad en humanos y otros mamíferos se ha atribuido al pleomorfismo natural que presenta *T. cruzi* demostrado en los estudios biológicos, bioquímicos y moleculares (Brener, 1969; de Scorza *et al.*, 1989; Magalhaes *et al.*, 1996; Suárez *et al.*, 2009; Rimoldi *et al.*, 2012).

Otras investigaciones consideran la incapacidad de la forma delgada para invadir una nueva célula después de su liberación del pseudoquiste, mientras que las formas gruesas muestran marcado tropismo por las fibras musculares y el tejido glandular dependiendo de la fuente de la cepa y de la fase de infección en el hospedador (Campos & Andrade, 1996; Tyler & Engman, 2001).

Más específicamente es de destacar que con la metodología utilizada se detectaron tripomastigotos en la cavidad peritoneal cinco días antes de encontrarse en la sangre periférica para la cepa P6, hecho que no ha sido descrito en los estudios de la enfermedad de Chagas. La literatura señala que distintas cepas de *T. cruzi* altamente invasivas se diseminan por el torrente sanguíneo a los distintos órganos y tejidos, generando eventos inmunológicos y marcado tropismo y patogenicidad del parásito (Moreno, 1983; Alarcón *et al.*, 2006). El registro de localización peritoneal de formas flageladas lo refirieron en México Martínez & Martín en 1981 en ratones infectados con *T. cruzi* aislado de *Triatoma phyllosoma*. Recientemente en Venezuela fue reportada la proliferación de tripomastigotos en el fluido ascítico de ratones con infección aguda producidas por diferentes cepas de *T. cruzi* (Araujo *et al.*, 2011).

Tabla I. Tejidos de los ratones infectados con las cepas P6 y P11 de *T. cruzi*, que mostraron infiltrado de células inflamatorias y nidos de parásitos en secciones coloreadas con Hematoxilina y Eosina y en secciones tratadas con Peroxidasa-antiPeroxidasa.

Tejidos de ratones Infectados	Hematoxilina-Eosina				Peroxidasa-antiPeroxidasa	
	Infiltrado celular		Nidos de parásitos		Antígeno de <i>T. cruzi</i>	
	P6	P11	P6	P11	P6	P11
Cepas de <i>T. cruzi</i>						
Membrana peritoneal	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Músculo esquelético	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Corazón	++	+	+	-	+++	+++
Bazo	++++	++	-	-	+++	+++
Riñón	+	++	-	-	+	+++
Hígado	++	+++	-	-	++	++
Estómago	++	+	-	-	-	++
Intestino delgado	++	+	-	-	+++	+
Intestino grueso	++	++	-	-	+	+
Pulmón	+	+	-	-	-	+
Vejiga	+	-	-	-	+	+
Testículo	+	-	-	-	-	++
Pene	+	-	+	-	++	-

Parasitismo e infiltrado celular en los tejidos: ausente (-), escaso (+), moderado (+), intenso (+++)

Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que el tropismo de *T. cruzi* procedente de la cepa P6 con alta eficiencia multiplicativa inicial en el LA y luego en la sangre del 100% de los ratones, pudiera asociarse con propiedades como la virulencia de las cepas, lo que depende en gran medida del comportamiento biológico de los parásitos y de la respuesta fisiológica e inmunológica del hospedador (Deane *et al.*, 1984; Atwood *et al.*, 2005).

La infección de la membrana peritoneal por dos cepas de *T. cruzi* en los ratones, pudiera relacionarse también con la exposición previa al sistema inmunológico del hospedador en donde el parásito induce una respuesta que conduce a un estado de inmunosupresión humoral y celular y mecanismo de evasión del complemento, respuestas que disminuyen con el tiempo generando una persistencia y cronicidad parasitaria (Macedo *et al.*, 2002; Tapia *et al.*, 2012; Haberland *et al.*, 2012).

La diseminación de los parásitos hacia la cavidad peritoneal y la formación de nidos de amastigotos, la forma multiplicativa de los parásitos y de tripomastigotos en la membrana peritoneal condujeron a la desorganización estructural de la

MP, favoreciendo la ascitis por acumulación anormal de fluido en la cavidad peritoneal y peritonitis por inflamación del peritoneo.

Estas patologías solo han sido descritas en pacientes humanos inmunosuprimidos por efectos del SIDA que han sufrido reactivación de la infección chagásica acompañada de alta parasitemia, con tripomastigotos en el fluido pleural y desarrollo de peritonitis espontánea, quizás debido a una efusión pleural sufrida por el paciente (Iliovich *et al.*, 1998; Menghi *et al.*, 2011).

En este sentido consideramos importante señalar que la preferencia de *T. cruzi* de la cepa P6 hacia la cavidad peritoneal y luego a la sangre circulante, es un comportamiento que no ha sido antes señalado y requiere ser estudiado, a fin de comprender los factores que regulan la proliferación de formas del parásito en la patogénesis de la infección por *T. cruzi* (Deloris *et al.*, 2003).

La aparición de los tripomastigotos en la sangre circulante y luego en el líquido ascítico de los ratones infectados con la cepa P11 es otro hallazgo poco común y pudiera deberse a que las formas

metacíclicas de entrada del parásito al hospedador, estimularían la producción de proteínas ribosomales y un mecanismo de defensa antioxidante como adaptación previa a la fagocitosis, mientras que las formas sanguíneas del parásito producirían proteínas específicas de la familia de la trans-sialidasas, que desviarían la respuesta inmune o bloquearían la respuesta de las células T (Martín & Tarleton, 2004).

Bajo condiciones experimentales, la infección con distintos aislados de *T. cruzi* presentan un tropismo e infectividad en diferentes tejidos, siendo la musculatura cardíaca y muscular esquelética las más comprometidas y con menor frecuencia la infección intra-abdominal en la que se ha encontrado dilatación y adelgazamiento de la capa mucosa del colon con pérdida de los pliegues y de los plexos mioentéricos (Guillén *et al.*, 2001). Otras investigaciones han señalado alteraciones en la unión neuromuscular asociada a la degeneración de la fibra nerviosa muscular provocando anormal actividad motora de las patas posteriores de ratones con infección aguda por las cepas P6 y P11 de *T. cruzi* (Lugo de Yarbuh *et al.*, 2006).

Las evidencias sugieren que el daño tisular e inflamatorio que sufren los tejidos dependería de la agresión por antígenos de *T. cruzi* a los tejidos del hospedador, con participación del sistema inmune y reacción cruzada entre *T. cruzi*, los tejidos y los receptores moleculares en la superficie de las células fagocíticas, en especial con macrófagos peritoneales de ratón, primera línea celular invadida por el parásito (Kipnis *et al.*, 1979). Se ha referido que diferentes moléculas del parásito producirían activación policlonal asociada a elevadas parasitemias, una depresión de la respuesta inmune celular y que el parásito se diseminaría en el organismo originando una compleja respuesta inflamatoria de subpoblaciones de linfocitos por mecanismos inmunológicos que caracterizan una infección aguda por *T. cruzi* (Minoprio *et al.*, 1988).

En el presente trabajo también se observó que durante el curso de la infección aguda los ratones desarrollaron manifestaciones clínicas causando emaciación muscular importante, caracterizada por una gran depleción de masa corporal, lo que pudiera ser indicativo de malnutrición energético-proteínica grave por merma involuntaria de la ingesta de alimentos (De Onis *et al.*, 1993). Por otro lado, se presume que la disnea en los ratones infectados

se deriva de la congestión venosa pulmonar, uno de los síntomas de insuficiencia cardíaca en humanos con enfermedad de Chagas, extrapolable al modelo murino (Richardson *et al.*, 1996).

Finalmente concluimos que es necesario realizar nuevos estudios que consideren diferentes cepas de tripomastigotos en la infección experimental de animales, basados en la detección de la parasitemia, parasitismo en la cavidad intra-peritoneal y síntomas clínicos los cuales pudieran también presentarse en humanos con infección aguda.

Conflicto de intereses

Ninguno.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Desarrollo Científico Tecnológico y de las Artes (CDCHTA) de la Universidad de Los Andes. Código del Proyecto: C-1822-13-03-B. Nuestro agradecimiento al Dr. Rafael Bonfante Cabarcas de la Unidad de Bioquímica de la Universidad Centro Occidental "Lisando Alvarado", Barquisimeto, Venezuela, por habernos cedido las cepas de *T. cruzi*.

REFERENCIAS

- Alarcón de Noya B., Díaz-Bello Z., Colmenares C., Ruíz-Guevara R., Mauriello L. *et al.* (2010). Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas' disease at a School in Caracas, Venezuela. *J. Intern. Dis.* **201**: 1308-1315.
- Alarcón M., Lugo de Yarbuh A., Moreno E., Payares G., Araujo S. & Colmenares M. (2006). Presencia de *Trypanosoma cruzi* en tejidos de rata Wistar infectadas experimentalmente y sus fetos. *Bol. Malaria. Salud. Amb.* **46**: 137-148.
- Alarcón M., Moreno E., Colasante C., Lugo de Yarbuh A., Cáceres K. & Araujo S. (2011). Presencia de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* en el plasma seminal de ratones con infección aguda. *Bol. Malaria. Salud. Amb.* **51**: 237-239.
- Andrade S. G. (2000). Patología experimental da doença de Chagas. *In*: Brener, Z.; Andrade.,

- Z. A. & Barral-Netto M. (eds.). *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. 2ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 177-200 pp.
- Araujo S., Alarcón M., Lugo de Yarbuh A. & Moreno E. (2011). Eficiencia de un método para la confirmación de *Trypanosoma cruzi* en el líquido ascítico de ratones con infección aguda. *Biomédica*. **3**: 330.
- Atwood J. A., Weatherly D. B., Minning T. A., Bundy B., Cavola C., Opperdoes F. R., et al. (2005). The *Trypanosoma cruzi* proteoma. *Science*. **309**: 473-476.
- Berrizbeitia M., Aguilera G., Ward B., Rodríguez J., Jorquera A. & Ndao M. (2010). Seroprevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* en la población rural de Miraflores, estado Monagas. Estabilidad y diferencia de reactividad de epimastigotes fijados. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* **30**: 55-60.
- Bonfante-Cabarcas R., Rodríguez-Bonfante C., Vielma B; García D., Mogollón-Saldivia A., Aldana E. & Concepción J. L. (2011). Seroprevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* y factores asociados en un área endémica de Venezuela. *Cad. Saúde Pública. Rio de Janeiro*. **10**: 1917-1929.
- Brener Z. (1962). Observações sobre a imunidade a superinfecciones em camundongos experimentalmente inoculados com *Trypanosoma cruzi* e submetidos a tratamento. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. **4**: 119-123.
- Brener Z. (1969). The behavior of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the blood-stream of normal and immune mice. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **65**: 215-20.
- Brenière S. F., Aliaga C., Waleckx E., Buitrago R., Salas R., et al. (2012). Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* DTUs in wild *Triatoma infestans* from Bolivia: Predominance of *T. crI*. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* **5**: 1650.
- Cacéres K. (2011). *Evaluación de las lesiones en los tejidos de ratones con infección aguda producida por Trypanosoma cruzi aislado de un caso chagásico*. Trabajo Especial de Grado. Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes. 72pp.
- Camargo M. (1966). Fluorescent antibody test for xenodiagnosis. Technical modifications employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in slide test. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. **8**: 227-234.
- Campos R. M. F. & Andrade S. G. (1996). Characterization of subpopulations (clones and subclones) of the 21 SF strain of *Trypanosoma cruzi* after long lasting maintenance in the laboratory. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **91**: 795-800.
- Carrasco H. J., Frame I., Valente S. & Miles M. (1996). Genetic Exchange as a possible source of genomic diversity in sylvatic population of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. J. Trop. Med. Hyg.* **54**: 418-424.
- Carrasco H. J., Segovia M., Llewellyn M., Morocoima A., Urdaneta-Morales S. Martínez C. et al. (2012). Geographical distribution of *Trypanosoma cruzi* genotypes in Venezuela. *Plos Negl. Trop. Dis.* **6**: e1707.
- Chagas C. (1909). Nova tripanozomíaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida to homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **1**: 159-218.
- Dao L. (1949). Otros casos de enfermedad de Chagas en el estado Guárico (Venezuela): formas agudas y crónicas: observación sobre enfermedad de Chagas congénita. *Rev. Policlin.* Caracas **17**: 17-32.
- Deane M., Jansen a., Mangia R. et al. (1984). Are our laboratory strains representative samples of *T. cruzi* populations that circulate in nature?. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **79**: 19-24.
- De Jesús R. (2002). Bioética animal en Venezuela. *Rev. Fac. Farmacia. ULA*. **43**: 15-18.
- Deloris A., Villalta F. & Lima M. (2003). Transforming Growth Factor α Binds to *Trypanosoma cruzi* amastigotes to induce signaling and cellular proliferation. *Infect. Immunol.* **7**: 4201- 4205.
- De Onis M., Monteiro C., Akre J. & Clugston G. (1993). The worldwide magnitude of protein-energy malnutrition: an overview from the WHO Global

- Database on Child Growth. WHO Bull OMS. **71**: 703-712.
- De Scorza C., Urdaneta-Morales S. & Sampson-Ward L. (1989). Urban *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: pathology in white mice of isolates from *Panstrongylus geniculatus*. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* **69**: 283-289.
- Días Bello Z., Zavala-Jaspe R., Díaz-Villalobos M., Mauriello L., Maeckelt A. & Alarcón de Noya B. (2008). Diagnóstico confirmatorio de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* en donantes referidos por bancos de sangre en Venezuela. *Invest. Clin.* **49**: 141-150.
- Feliciangeli M., Carrasco H., Patterson J., Suárez B., Martínez C. & Medina M. (2004). Mixed domestic infestation by *Rhodnius prolixus* Stål, 1859 and *Panstrongylus geniculatus* Latreille, 1811, vector incrimination, and seroprevalence for *Trypanosoma cruzi* among inhabitants in El Guamito, Lara State, Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **71**: 501-505.
- Galaviz SL., Ramírez E. & Vásquez V. (1992). Histotropismo y patogenicidad de *Trypanosoma cruzi* en ratón albino (NHI) aislado de triatominos en Nuevo León, México. *Bol. Chil. Parasitol.* **47**: 3-10.
- Guillén B., Lugo de Yarbuh A. & Moreno E. (2001). Dilatación del tracto digestivo de ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*. *Invest. Clin.* **42**: 195-209.
- Haberland A., Saravia SG., Wallukat G., Ziebig R. & Schimke I. (2012). Chronic chagasic disease: from basics to laboratory medicine. *Clin. Chem. Lab. Med.* **0**: 1-24.
- Herrera L., Urdaneta-Morales S. & Carrasco H. (2003). *Trypanosoma cruzi*: Behavior of metatrypomastigotes from *Didelphis marsupialis* and *Panstrongylus geniculatus*. *Rev. Cient. FCV-LUZ.* **13**: 307-311.
- Iliovich E., Lopez R., Kumi M. & Uzandizaga G. (1998). Peritonitis espontánea chagásica en un enfermo con SIDA. *Medicina.* **58**: 507-508.
- Kipnis T., Calich V. & Dias da Silva W. (1979). Active entry of bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi* into macrophages. *Parasitology.* **78**: 89-98.
- Lenzi H., Oliveira D., Lima M. & Gattas C. (1996). *Trypanosoma cruzi*: paninfectivity of cell strain during murine acute infection. *Exp. Parasitol.* **84**: 16-27.
- Lugo de Yarbuh A., Colasante C., Alarcón M. & Moreno E. (2006). Gastrocnemius skeletal muscle microvasculature and neuromuscular junction alterations in mice with experimental acute infection. *Rev. Cient. FCV-LUZ.* **6**: 593-603.
- Lugo de Yarbuh A., Araujo S., Colasante C., Alarcón M., Moreno E., De Ascensão A. & Carrasco H. J. (2010). Effects of the acute infection by different *Trypanosoma cruzi* strains in rats fetuses. *Rev. Cient. FCV-LUZ.* **20**: 353-361.
- Macedo A. M., Oliveira R. O. & Pena S. D. (2002). Chagas' disease: Role of parasite genetic variation in pathogenesis. *Exp. Rev. Mol. Med.* **4**: 100-106.
- Magalhaes J. B., Andrade S. G. & Sherlock Y. (1996). *Trypanosoma cruzi* strains: behavior after passage into autochthonous or foreign species of triatomine biological and biochemical patterns. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* **38**: 23-28.
- Martin D. & Tarleton R. (2004). Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunol. Rev.* **201**: 304-17.
- Martín A. & Del Castillo J. (2004). *Bioestadística para ciencias de la salud*. Ed. Norma. Madrid. España.
- Martínez M. & Martín E. (1981). Una nueva cepa de *Trypanosoma* tipo cruzi con localización peritoneal preferente. *Salud Pública.* **23(1)**: 23-24.
- Menghi C., Gatta de N. C., Angeleri A., Rocher A. & Palaoro L. (2011). *Trypanosoma cruzi*: tripomastigotes en líquido pleural de un paciente con SIDA. *Rev. Chil. infectol.* **6**: 597-589.
- Minoprio P., Burlen O., Pereira P., Guilbert B., Andrade L. et al. (1988). Most B cells in acute *Trypanosoma cruzi* infection lack parasite specificity. *Scand. J. Immunol.* **5**: 553-561.
- Moreno E. (1983). Parasitemias en ratones albinos por *Trypanosoma cruzi* recién aislados de *Rhodnius prolixus* domésticos en el estado Trujillo, Venezuela. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **23**: 44-59.

- Moreno E., Rivera I., Moreno S., Alarcón M. & Lugo-Yarbu, A. (2003). Transmisión vertical de *Trypanosoma cruzi* en ratas Wistar durante la fase aguda de la infección. *Invest. Clin.* **44**: 241-254.
- Morocoima A., Rodríguez M., Herrera L. & Urdaneta-Morales S. (2006). *Trypanosoma cruzi*: experimental parasitism of bone and cartilage. *Parasitol. Res.* **6**: 663-668.
- Morocoima A., Tineo E., Ferrer E., Herrera L. & Núñez M. (2008). Enfermedad de Chagas en el estado Anzoátegui, Venezuela. Registro de un caso agudo y caracterización parasitológica y molecular del aislado. *Bol. Malariol. Salud. Amb.* **2**: 121 – 126.
- OPS/IPCA (2010). *XII Reunión de la Comisión Intergubernamental de la Iniciativa de los Países de Centro América (IPCA) para la Interrupción de la Transmisión Vectorial, Transfusional y Atención Médica de la Enfermedad de Chagas en El Salvador; Evolución Histórica y Desafíos para el Control de Chagas*. San Salvador, El Salvador
- Paredes J. L., Moreno E., Premoli G., Alarcón M., Lugo de Yarbu A., Villareal J. *et al.* (2009). Efecto de la ingestión de una dieta con alto contenido en grasa en ratas Wistar crónicamente infectadas con *Trypanosoma cruzi*. *Kasmera.* **31**: 74-98.
- Pedreira de Castro M. A. & Brener Z. (1985). Estudio parasitológico, e anátomo-patológico da fase aguda da doença de Chagas em cães inoculados com duas diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **4**: 223-29.
- Richardson P., McKenna W., Bristow M., Maisch B., Mautner B., O'Connell J., *et al.* (1996). Report of the 1995 World Health Organization/ International Society and Federation of Cardiology Task Force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Circulation.* **93**: 841-842.
- Rimoldi A., Alves R., Ambrósio DL., Tita M. Z., Martinez I., Freitas R., Barreto R. & Aristeu J. (2012). Morphological, biological and molecular characterization of three strains of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) isolated from *Triatoma sordida* (Stal) 1859 (Hemiptera, Reduviidae) and a domestic cat. *Parasitol.* **139**: 37-44.
- Rodríguez-Bonfante C., Amaro A., García M., Mejías Wohlert L. E., Guillén P., García RA., Álvarez N., Díaz M., *et al.* (2007). Epidemiología de la enfermedad de Chagas en el Municipio Andrés Bello Blanco, Lara, Venezuela: infestación triatomínica y seroprevalencia en humanos. *Cad. Saúde. Públ.* **23**: 1133-1140.
- Sell P. & Burton M. (1981). Identification of Leishmania amastigotes and their antigens in formalin fixed tissues by immunoperoxidase staining. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **75**: 461-379.
- Serrano O., Mendoza F., Suárez B. & Soto A. (2008). Seroepidemiología de la enfermedad de Chagas en dos localidades del municipio Costa de Oro, estado Aragua, Venezuela. *Biomédica.* **28**: 108-115.
- Suárez N., Cabrera R., Cartagena L. & Ayaqui R. (2009). Características biológicas de una cepa de *Trypanosoma cruzi* en el modelo murino y análisis de supervivencia. *Rev. Perú. Med. Exp. Salud. Pública.* **26**: 187-192.
- Sulbarán D. (2011). Efecto de la infección aguda por *Trypanosoma cruzi* sobre la virulencia y patogenicidad en ratones. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias. Universidad de los Andes. 40 pp.
- Tapia V., Galdames P. & Ramírez G. (2012). Mecanismos de evasión del sistema del complemento utilizados por *Trypanosoma cruzi*. *Avan. Cienc. Vet.* **2**: 10-19.
- Tyler K. M. & Engman D. M. (2001). The life of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int. J. Parasitol.* **31**: 472-481.

Recibido el 27/06/2013
Aceptado el 15/11/2013